

THIN MEMBRANE OF IMMOBILIZED ENZYME

Publication number: JP62228274

Publication date: 1987-10-07

Inventor: AIZAWA MASUO; CHIBA TSUNEO; SHINOHARA HIROAKI

Applicant: MITSUBISHI CHEM IND

Classification:

- international: C12N11/08; G01N27/30; G01N27/327; G01N27/40;
C12N11/00; G01N27/30; G01N27/327; G01N27/40;
(IPC1-7): C12N11/08; G01N27/30; G01N27/40

- European:

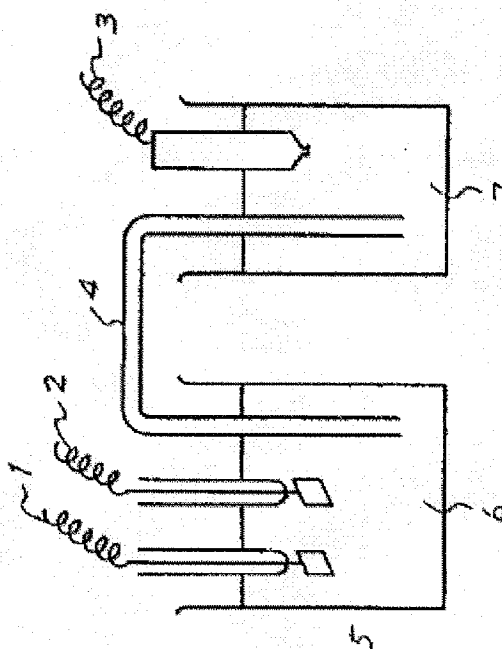
Application number: JP19860070362 19860328

Priority number(s): JP19860070362 19860328

Report a data error here

Abstract of JP62228274

PURPOSE:The titled thin membrane, consisting of a polymer of an aniline compound having glucose oxidase, capable of holding enzymic activity, having high selectivity and improved oxygen permeability and useful for simple and tough biosensors, detecting devices for blood sugar values in clinical tests, etc. **CONSTITUTION:**A glass electrolytic cell 5 having platinum electrodes as a working electrode 1 and counter electrode 2 and further Ag.AgCl electrode as a reference electrode 3 is used to carry out electrochemical polymerization in a 0.1M H₂SO₄ solution containing 0.1M aniline and glucose oxidase at a constant temperature for 120sec by applying 0.9V voltage. Thereby the surface of the platinum electrodes is discolored to light green and the aimed polyaniline membrane containing the glucose oxidase is obtained.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-228274

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)10月7日

C 12 N 11/08
G 01 N 27/30
27/40

7133-4B
J-7363-2G
7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑮ 発明の名称 固定化酵素薄膜

⑯ 特 願 昭61-70362

⑰ 出 願 昭61(1986)3月28日

特許法第30条第1項適用 昭和61年3月12日 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第52春季年会講演予稿集I」に発表

⑱ 発 明 者	相 澤 益 男	東京都杉並区天沼2丁目19番14号
⑲ 発 明 者	千 葉 恒 雄	横浜市金沢区六浦町70番地
⑳ 発 明 者	篠 原 寛 明	東京都目黒区緑ヶ丘3丁目2番5号
㉑ 出 願 人	三菱化成工業株式会社	東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
㉒ 代 理 人	弁理士 長谷川 一	外1名

明 細 書

1 発明の名称

固定化酵素薄膜

2 特許請求の範囲

グルコースオキシダーゼを有するアニリン類の重合体からなることを特徴とする固定化酵素薄膜

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は固定化酵素薄膜に係り、更に具体的には、グルコースオキシダーゼの酵素活性を保持したアニリン類の重合体からなる固定化酵素薄膜に関する。

(従来技術)

従来、酵素の固定化方法としては、包括法、架橋化法、共有結合法等が知られている。更に最近、固定化酵素薄膜として、例えば電気化学重合法により、グルコースオキシダーゼ・ポリピロール導電性酵素薄膜が作られた。ところが

このようなポリピロール酵素薄膜は、その導電性ゆえ、電極被覆膜として使用する場合、選択性に劣るという欠点があつた。すなわち、酵素活性を発現させる設定電位において、ポリピロール薄膜表面で種々の分子が反応を起こすという問題点があつた。

(発明の目的)

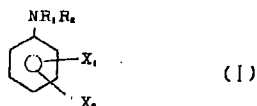
本発明の目的は、選択性に優れ、かつ簡便で強固な固定化酵素薄膜を提供することにある。また、酸素透過性の優れた固定化酵素薄膜を提供することにある。

(発明の構成)

本発明の目的は、グルコースオキシダーゼを有するアニリン類の重合体からなる固定化酵素薄膜によつて達成される。

以下詳細に本発明を説明する。

まず、本発明に係るアニリン類としては、例えば一般式(1)で表わされるものが挙げられる。



上記式中、 R_1 、 R_2 は水素原子またはメチル基、エチル基等のアルキル基を表わし、 X_1 、 X_2 は水素原子、アミノ基、メチル基、エチル基等のアルキル基、メトキシ基、エトキシ基等のアルコキシ基、フェノキシ基、アミノフェノキシ基等のアリールオキシ基、カルボキシ基、トリフルオロメチル基等のフッ素置換アルキル基を表わし、また、 X_1 、 X_2 は芳香環又は複素環を形成していてもよい。更に具体的には、一般式(I)で表わされるアニリン類として、アニリン、*o*-フェニレンジアミン、*p*-トルイジン、*4*-メトキシアニリン、*2,6*-ジメチルアニリン、*2,5*-ジメトキシアニリン、*N*-メチルアニリン、*N*-エチルアニリン、*4,4'*-ジアミノジフェニルエーテル、*4*-アミノ安息香酸、*2*-トリフルオロメチルアニリン、*5*-アミノ-*1,10*-

用極・対極に制限はなく、それぞれ例えばガラスセルおよび白金電極等が使用できる。定電位で重合する場合、良質な膜を得るため設定電位は0.5 V vs Ag-AgCl以上であることが望ましい。また、重合温度は、例えば通常5℃～50℃の間から選ばれる。

このようにして得られる固定化酵素薄膜は、選択性の高い酵素活性を有し、更に酵素膜は電極表面に強固に付着して容易にはがれず、酸素透過性も良い。

(実施例)

以下に実施例を示し、本発明の固定化酵素薄膜について更に詳細に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1

実験装置の概略を図1に示す。白金電極を作用極および対極とし、Ag-AgCl電極を参照電極としたガラス製電解セルを用い、0.1 M アニリンとグルコースオキシダーゼ10 mgを含む0.1

フェナントロリン等が例示できる。

本発明で使用するグルコースオキシダーゼは、グルコースを酸化してD-グルコン酸を生ずる反応を触媒する公知の酵素である。

本発明の固定化酵素薄膜は、上記のアニリン類とグルコースオキシダーゼを、電気化学重合法などの常法を用いて固定化することにより製造される。

すなわち、例えば、電解液中にアニリン類およびグルコースオキシダーゼを加え、Ag-AgCl電極を参照電極とした電解セル内において、定電位あるいは定電流電気化学重合法により、一定温度で行なわれる。ここで使用される電解液に制限はなく、例えば0.1 mM以上の硫酸あるいは適当濃度のリン酸緩衝液等が選ばれるが、酸性度が上がるほど固定化酵素薄膜の酵素活性は良くなる傾向にある。また、アニリン類およびグルコースオキシダーゼの濃度はそれぞれ例えば、2.5 mM～1 Mおよび0.1 mg/ml～50 mg/mlの範囲が適当である。更に、電解セルおよび作

M H₂SO₄溶液2 ml中で、一定温度において、120秒間、0.9 V (対Ag-AgCl)の定電位をかけて電気化学重合を行なった。

この時、白金電極表面は薄緑色に変色した。終了後、白金電極表面に酵素固定化ポリアニリン膜が生成され、かつ酵素活性が保持されていることを確かめるために、ベルオキシダーゼ法を採用した。すなわち、電極を洗浄後乾燥し、1 M グルコース0.3 ml、0.1 M フェノール0.3 ml、0.1 M 4-アミノアンチピリン0.3 ml、0.5 mg/ml ベルオキシダーゼ0.3 mlおよび0.1 M リン酸緩衝液1.8 mlの混合溶液中に浸漬した。約15分間放置した後、503 nmの可視光スペクトルを測定した。可視光スペクトルの吸光度から、グルコースオキシダーゼの酵素活性量を求めると、276 ng/cm²であつた。

尚、ポリアニリン膜の酸素透過性を調べるため、前述の方法においてアニリンのみを使用して白金電極表面にポリアニリン膜を生成させ、これを0.1 M リン酸緩衝液中、0～-0.6 V

(対 $Ag/AgCl$) の電位域で常法に従い電位走査を行つたところ、第2図に示すように、酸素ガスの通気により還元電流は大きく増大し、膜中を酸素が透過し、白金電極上で電気化学還元されることが分つた。

実施例2

0.1 M リン緩衝液 2 ml に、0.1 M アニリンおよびグルコースオキシダーゼ 9.9 mg を溶かし、実施例1と同様な方法で電気化学重合を行なつた。この時、白金電極表面は薄黄銅色となつた。終了後、ペルオキシダーゼ法によりグルコースオキシダーゼの活性量を求めると、115 ng/ml であつた。

(発明の効果)

本発明によれば、酵素活性を保持し、選択性が高く、更に酸素透過性の良い強固な固定化酵素薄膜が得られる。本発明の固定化酵素薄膜はバイオセンサーや、臨床検査用のグルコース検出装置、あるいはグルコン酸生成のバイオリアクター等への応用が可能である。

更に、電気化学重合法などを用いれば、微小な電極の表面に容易に固定化酵素薄膜を作製できるため、ミクロなパターンを有したバイオ素子を形成する有力な手段となりうる。

図の簡単な説明

図1は、実施例で使用した電解装置の概略図を示す。

図2は、実施例1で製造したポリアニリン膜の酸素透過性を示す。

- ① 作用極
- ② 対極
- ③ 参照極
- ④ 塩橋
- ⑤ ガラス製電解セル
- ⑥ 電解液
- ⑦ KCl飽和溶液

出願人 三菱化成工業株式会社
代理人 弁理士 長谷川 一
(ほか1名)

図1

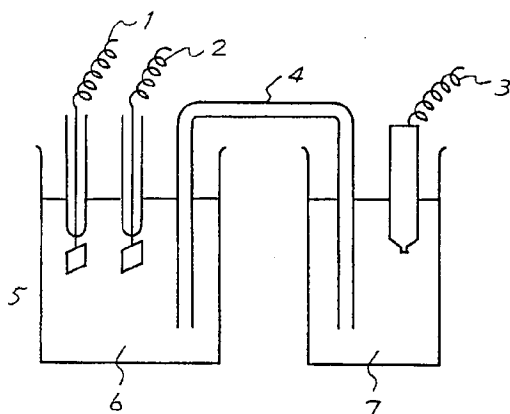


図2

